

Thèse de Doctorat

Katarzyna M. ROMEK

Badania frakcjonacji izotopowej ^{13}C podczas biotransformacji i w reakcjach enzymatycznych

Studies of isotopic fractionation of ^{13}C during biotransformation and in enzymatic reactions

Streszczenie

Możliwość monitorowania stosunków izotopowych za pomocą spektrometrii ^{13}C NMR (irm- ^{13}C NMR) pozwala na bezpośrednią analizę rozkładu izotopowego dla poszczególnych atomów węgla w badanej próbce. W przedłożonej pracy zostało przyjęte właśnie to podejście celem rozwinięcia metodologii oraz wyjaśnienia fenomenu frakcjonacji izotopowej zachodzącej na drodze ścieżek biosyntetycznych w roślinach oraz szerokiej gamie alkaloidów (nikotyna, tropina oraz tramadol), które charakteryzują się szeregiem podobieństw w kwestiach biosyntetycznych.

Kluczową cechą pomiędzy tymi związkami jest obecność grup O- i/lub N-metylowych. Powszechnie znanym faktem jest wyjątkowo niski stosunek izotopowy $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ w grupach O- i N-metylowych w związkach naturalnego pochodzenia względem pozycji poszczególnych atomów węgla w cząsteczce. Rozprawa skupia się na wyjaśnieniu tego fenomenu.

Przeważająca większość grup metylowych w związkach naturalnych pochodzi z reakcji przeniesienia grupy S-metylowej z L-metioniny (L-Met) poprzez S-adenozyl metioninę (AdoMet). Za pomocą spektrometrii irm- ^{13}C NMR zostało pokazane, że grupa S-metylowa L-Met będącej donorem grupy metylowej, wykazuje znaczne zubożenie $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$. W poszukiwaniu przyczyny tego zjawiska został stworzony niewielki model teoretyczny enzymu – kobalamino-niezależnej syntazy metioniny – odpowiedzialnego za przeniesienie grupy metylowej podczas biosyntezy L-Met. Obliczenia teoretyczne wykazały wysoką barierę energetyczną dla tej reakcji oraz powiązany z nią duży kinetyczny efekt izotopowy atomie węgla.

Dodatkowo została rozwinięta metodologia na potrzeby zbadania stosunków izotopowych $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ aminokwasów, co umożliwiło wgląd we frakcjonację izotopową występującą podczas biosyntezy aminokwasów.

Kolejnym aspektem pracy są zgromadzone wyniki, które umożliwiły: (i) porównanie związków naturalnych z syntetycznymi, co pozwoliło na rozróżnienie ich pochodzenia, oraz (ii) interpretację modeli izotopowych w odniesieniu do biosyntetycznego pochodzenia związków naturalnych. Takie podejście umożliwiło, w przypadku tramadolu (nowoodkrytego związku naturalnego), zaproponowanie hipotetycznej ścieżki biosyntetycznej.

Słowa kluczowe : frakcjonacja izotopowa, irm- ^{13}C -NMR, teoretyczne KIE, produkty naturalne, rośliny, alkaloidy, aminokwasy

Abstract

The ability to carry out isotope ratio monitoring by ^{13}C NMR spectrometry (irm- ^{13}C NMR) gives direct access to position-specific isotope distributions in whole molecules. In this thesis this approach has been developed with the aim of elucidating isotopic fractionation during the biosynthetic pathways in plants of a number of alkaloids (nicotine, tropine and tramadol) that have certain features of their biosynthesis in common.

One key common feature of these compounds is the presence of O-methyl and/or N-methyl groups. As it is generally found that the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratio in the O-methyl and N-methyl groups of natural products is exceptionally low relative to the other carbon positions in the molecule, the work focused on explaining this phenomenon.

The vast majority of these methyl groups in natural products are derived by the transfer of the S-methyl group from L-methionine (L-Met) via S-adenosyl methionine (AdoMet). It is shown by irm- ^{13}C NMR that in the donor molecule, L-met, the S-methyl group is impoverished. The cause of this was investigated by the study of a small theoretical model for the cobalamin-independent methionine synthase, the enzyme responsible for methyl group transfer in L-met biosynthesis. These calculations showed a high energy barrier for methyl group transfer and an associated large ^{13}C kinetic isotope effect.

In addition, a generic methodology to study the $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ratios in amino acids has been developed, which allows insight into the isotopic fractionation occurring during amino acid biosynthesis.

A further feature of the work is that the data allow: (i) a comparison of natural and commercial products, which enables distinguishing between sources, and (ii) an interpretation of the isotopic pattern in terms of the biosynthetic origin of natural compounds. For tramadol, this made it possible to propose a hypothetical pathway for this newly-discovered natural product.

Keywords: isotopic fractionation, irm- ^{13}C NMR, theoretical KIE, natural products, plants, alkaloids, amino acids